



TITLE:

# Multiple exposure photography methodによる精子運動の研究 - 各種薬剤の影響 -

AUTHOR(S):

羽間, 稔

---

CITATION:

羽間, 稔. Multiple exposure photography methodによる精子運動の研究 - 各種薬剤の影響 -. 泌尿器科紀要 1982, 28(6): 649-661

ISSUE DATE:

1982-06

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/123123>

RIGHT:

# Multiple exposure photography method による精子運動の研究

— 各種薬剤の影響 —

神戸大学医学部泌尿器科学教室（主任：石神襄次教授）

羽 間 稔

## STUDIES ON HUMAN SPERMATOZOAL MOTILITY WITH THE USE OF THE MULTIPLE EXPOSURE PHOTOGRAPHY METHOD

— EFFECTS OF VARIOUS COMPOUNDS —

Minoru HAZAMA

*From the Department of Urology, School of Medicine, Kobe University (Director: Prof. J. Ishigami)*

The effects of various compounds, such as Kallikrein,  $17\beta$ -estradiol, progesterone, prolactin, L-arginine, caffeine, and Solcoseryl, on sperm motility were studied. These compounds were added to fresh human semen offered by 28 volunteers who had presented with various findings, and the percentage of motile sperm and spermatozoal velocity were evaluated by objective semen analysis with the new multiple exposure photography (MEP) method using a stroboscope for photography and a computer for data analysis. Kallikrein slightly increased the percentage of motile sperm but the difference was not statistically significant. This effect was observed mainly in specimens of good sperm motility, but the mean spermatozoal velocity was not changed. No clear influence on sperm motility was obtained with  $17\beta$ -estradiol, progesterone, and L-arginine in seminal fluid. Prolactin slightly lowered the percentage of motile sperm, and significantly reduced the mean spermatozoal velocity. These results may suggest that there is a correlation between male infertility and elevation of serum and/or seminal prolactin level. Caffeine significantly increased the percentage of motile sperm, but decreased the mean spermatozoal velocity. These findings seem to be due to the fact that immotile live spermatozoa start to move slowly on the addition of caffeine. Solcoseryl suppressed the sperm movement.

These results are compared and discussed with the results of other reports.

**Key words:** Multiple exposure photography, Sperm motility, Sperm velocity, Male infertility, Medical drugs

### はじめに

精子運動能は妊孕力の良否を決定する重要な因子の1つである。しかし、この運動能を短時間に簡便かつ客観的に把握することは容易ではなく、現在まで幾多の試みがなされてきたがいまだ満足しうる検査法を得

るには至っていない。著者は、近年、この目的のために新しい multiple exposure photography method（以下 MEP 法）を開発<sup>1)</sup>し、臨床研究における精子運動能の客観的な評価を試み、本法の妥当性を報告してきた。最近では、data 処理に長時間を要する MEP 法の欠点を改善するため computer を応用し、その簡

便化を図っている<sup>2)</sup>。

ところで, in vitro における各種薬剤の精子運動能への影響に関する報告は多いが, そのほとんどが direct observation method など主観的な精液検査法によって行なわれたものであり, MEP 法など客観的な方法により評価されたものは少ない。そこで今回, 精子運動率および精子運動速度に対する7薬剤の影響を MEP 法により検討し, 興味ある知見を得たので報告する。

## 実験方法

### (1) 新しい MEP 法について

これに関しては前報<sup>1,2)</sup>に詳しいが概要を述べると以下の通りである。すなわち本法は精子の運動を写真上にとらえる撮影段階と, この写真をもとに各パラメーターを算出する解析段階の二部に大別される。撮影段階は, まず十分に混和した精液の一部を希釈せずに深さ  $10\mu\text{m}$  計算盤に入れ, これを位相差顕微鏡のス

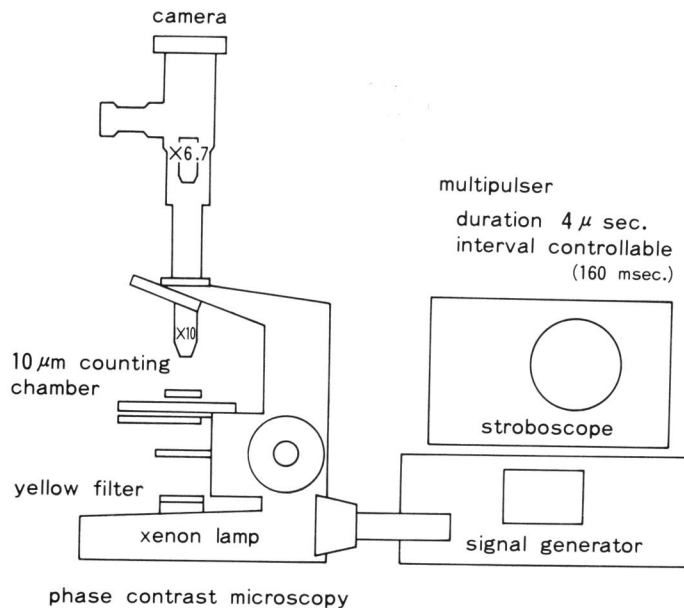


Fig. 1. Assembly of the system for multiple exposure photography

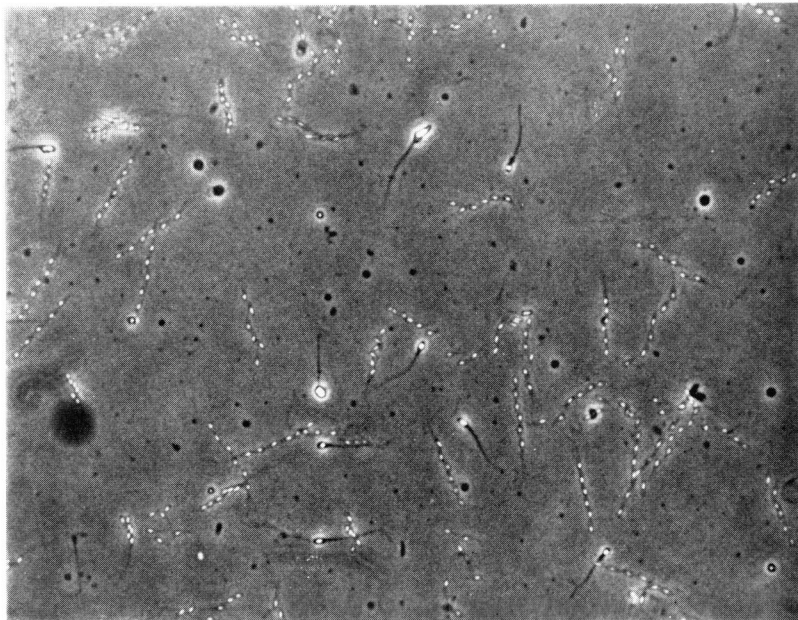


Fig. 2. Phase contrast photomicrograph of human seminal specimen taken with the new MEP method

ページ上に静置する。そして signal generator により  
発光間隔 160 msec, 閃光時間  $4\mu\text{sec}$  に制御した stro-

boscope (xenon lamp 使用) を光源として, 顕微鏡  
に取りつけた 35 mm still camera で 1 秒間撮影をお  
こなうものである (Fig. 1). この過程により 1 秒間に  
6 回 stroboscope が発光するので, 運動する精子はそ  
の軌跡にしたがい 6 つの頭部が鎖状に断続した形で認  
められ, 非運動精子は同位置で 6 回の閃光を受けるた

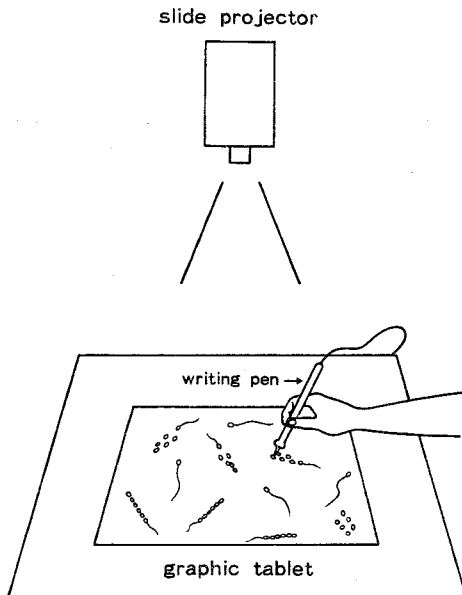
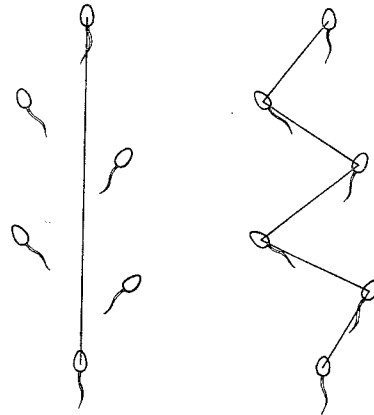


Fig. 3. Images of photographed spermatozoa are projected on a graphic tablet and traced with a writing pen



Straight line

Zigzag line

Fig. 4. Diagrams of two kinds of measurements of spermatozoal velocity

```
***** SAMPLE= 31 *****
TOTAL=245  MOTILE= 91  MOTILITY= 37.1%
TOTAL(REAL)= 40.8 X 10(6)  MOTILE(REAL)= 15.2 X 10(6)

-----
(DIRECT DISTANCE)      (POLYGONAL DISTANCE)
MEAN= 30.7  SD= 9.3    MEAN= 34.0  SD= 8.8
MEAN OF RATIO= 1.14

===== DISTRIBUTION OF DIRECT DISTANCE =====
    0-10   10-20   20-30   30-40   40-50   50-60
      1      11      35      28      14       2

    60-70   70-80   80-90   90-100  100-
      0       0       0       0       0

===== DISTRIBUTION OF POLYGONAL DISTANCE =====
    0-10   10-20   20-30   30-40   40-50   50-60
      1       2      26      42      16       3

    60-70   70-80   80-90   90-100  100-
      1       0       0       0       0

===== DISTRIBUTION OF RATIO =====
    1.0-1.1  1.1-1.2  1.2-1.3  1.3-1.4  1.4-1.5  1.5-1.6
       59      14       9      10       3       5

    1.6-1.7  1.7-1.8  1.8-1.9  1.9-2.0  2.0-
       2       3       2       2       2
```

Fig. 5. Printout of the results of semen analysis supplied by a computer

め運動精子に比べ理論上6倍の明るさで頭部から尾部まで明瞭に撮影される (Fig. 2).

次の解析段階では、まずこのスライド写真を slide projector で graphic tablet 上に大きく投影する。tablet 表面には磁力線がX軸方向とY軸方向にグリッド状に張られているので、投影された各精子頭部の像を writing pen で押さえていくと、電磁波によって生じた磁界の変化が pick up され、graphic computer terminal でペン位置に相当するデジタル情報 (X, Y 座標) に変換され computer に入力される (Fig. 3)。この際、非運動精子は1点として、運動精子は運動の軌跡にしたがった6点を一組として入力されるようにした。精子運動速度は Fig. 4 に示すように、個々の精子について、この6点を折れ線で結んだ距離 (zigzag line) を折れ線運動速度、第1と第6の頭部を直接結んだ距離 (straight line) を直線運動速度とした。そして、これら2種類の速度の平均、標準偏差、分布、さらに精子濃度、精子運動率を自動的に算出し、ラインプリンターから print out されるようにプログラムした (Fig. 5)。

## (2) 各種薬剤の添加実験

各種の薬剤が精子運動におよぼす影響について検討するため、上記の MEP 法を用いて以下のような実験を行なった。対象精液は28名の健康なボランティア (年齢20~26歳) から、禁欲3~5日後に用手法で提供されたもので、すべてがいわゆる normozoospermia ではない。採取された精液は1時間室温に放置し、十分に液化させた後、それぞれ 0.2 ml ずつ9本の試験管に分注した。そして、これに後述する各薬剤を溶解させた生理食塩水 0.2 ml ずつを加えよく混和した。各薬剤の濃度は多くの研究報告を検討し、最も効果が大きいとされている濃度を用いた。すなわち、最終濃度が Kallikrein 1 KU/ml, 17 $\beta$ -estradiol 320 nM/ml, progesterone 320 nM/ml, prolactin 50 ng/ml, L-arginine 5 mM/ml, caffeine 10 mM/ml, Solcoseryl 250 ml/l となるように調整した。このうち Kallikrein については kininogen の基質としての新鮮ヒト血清 0.02 ml を加えたものと加えないものの2種類を作製、使用した。また control には生理食塩水 0.2 ml のみを加えた。これら精液と試験薬剤の混合液を室温下に置き、添加1時間後、3時間後の精子運動率、精子運動速度を MEP 法により算出し、control の成績と比較検討した。なお、用いた精液の精子濃度は  $20 \times 10^6 \sim 148 \times 10^6$  /ml (平均  $69 \times 10^6$  /ml) であり、t 検定で各測定値の有意差を判定した。

## 結 果

### 1. control

Table 1 には対象精液に生理食塩水のみを加えた検体の添加1時間後 (採取2時間後)、添加3時間後 (採取4時間後) の精液所見の range, 平均値およびその標準偏差値を示した。すなわち、添加1時間後の精子運動率  $22.9 \pm 13.1\%$  (2.9~57.2%), 平均直線運動速度  $23.4 \pm 3.8 \mu\text{m/sec}$  (16.2~30.7  $\mu\text{m/sec}$ ), 平均折れ線運動速度  $31.1 \pm 4.1 \mu\text{m/sec}$  (21.1~37.6  $\mu\text{m/sec}$ ) であり、添加3時間後はそれぞれ  $22.3 \pm 11.7\%$  (1.8~54.4%),  $26.9 \pm 4.3 \mu\text{m/sec}$  (18.4~37.8  $\mu\text{m/sec}$ ),  $33.6 \pm 4.8 \mu\text{m/sec}$  (22.3~41.6  $\mu\text{m/sec}$ ) であった。以下、同一の対象精液を用いて、各薬剤の精子運動に対する影響について述べる。

Table 1. Means  $\pm$  standard deviation of spermatozoal velocity and percentage of motile spermatozoa in 28 control specimens after 1 hour and 3 hours incubation at room temperature

	Control (N=28)	
	Incubation time	
	1 hr (range)	3 hrs (range)
% motile spermatozoa (%)	$22.9 \pm 13.1$ (2.9~57.2)	$22.3 \pm 11.7$ (1.8~54.4)
Mean spermatozoal velocity (straight) ( $\mu\text{m/sec.}$ )	$23.4 \pm 3.8$ (16.2~30.7)	$26.9 \pm 4.3$ (18.4~37.8)
Mean spermatozoal velocity (zigzag) ( $\mu\text{m/sec.}$ )	$31.1 \pm 4.1$ (21.1~37.6)	$33.6 \pm 4.8$ (22.3~41.6)

### 2. Kallikrein

1 KU/ml 添加1時間後の運動率  $25.8 \pm 12.4\%$ , 直線運動速度  $23.5 \pm 3.1 \mu\text{m/sec}$  折れ線運動速度  $32.3 \pm 3.5 \mu\text{m/sec}$ , 3時間後はそれぞれ  $27.1 \pm 15.7\%$ ,  $26.2 \pm 4.5 \mu\text{m/sec}$ ,  $33.8 \pm 5.0 \mu\text{m/sec}$  であった。また Kallikrein と新鮮ヒト血清 0.02 ml を加えたものでは、1時間後の運動率  $26.4 \pm 14.3\%$ , 直線運動速度  $23.5 \pm 3.3 \mu\text{m/sec}$ , 折れ線運動速度  $31.6 \pm 4.6 \mu\text{m/sec}$  で、3時間後はそれぞれ  $25.2 \pm 14.1\%$ ,  $26.5 \pm 4.3 \mu\text{m/sec}$ ,  $33.9 \pm 4.0 \mu\text{m/sec}$  であった。血清添加の有無にかかわらず control と比べて精子運動率は上昇傾向を示したが有意差はなく、運動速度にも差がなかった (Fig. 6)。そこで、これらの成績を1時間後の control の運動率により、30%以上のもの (A群), 15~30% (B群), 15%未満 (C群) の3群に分け、運動率の差により

Kallikrein の効果に相違があるかどうかを検討した。添加3時間後の運動率を、Kallikrein と血清添加、Kallikrein のみ添加、control の順に平均値で示すと、A群(8例)では40.0%, 39.4%, 31.7%であったのに対し、B群(11例)では24.7%, 29.8%, 23.7%, C群(9例)では12.6%, 13.0%, 11.1%となり、運動率の良好なA群で Kallikrein による運動率上昇が認められた。しかし添加1時間後の運動率、平均運動

速度は、各群の間にはほとんど相違はなかった。(Fig. 7, 8, 9).

### 3. $17\beta$ -estradiol

添加1時間後の運動率 $23.3 \pm 14.4\%$ 、直線運動速度 $23.4 \pm 3.7 \mu\text{m}/\text{sec}$ 、折れ線運動速度 $31.9 \pm 4.9 \mu\text{m}/\text{sec}$ で、3時間後はそれぞれ $21.7 \pm 11.7\%$ 、 $25.7 \pm 3.5 \mu\text{m}/\text{sec}$ 、 $32.4 \pm 4.8 \mu\text{m}/\text{sec}$ であった。これらはすべて control と有意差はなかった (Fig. 10).

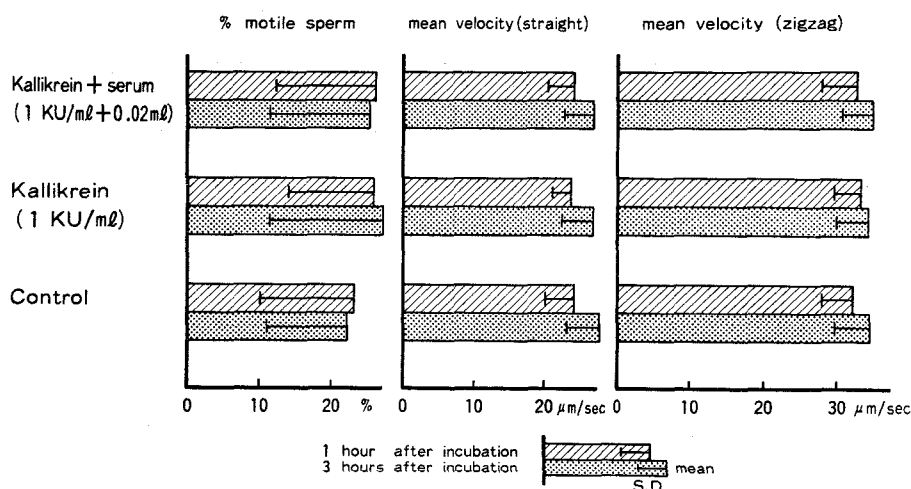


Fig. 6. Effects of in vitro additions of Kallikrein and Kallikrein plus fresh human serum compared with controls on the percentage of motile spermatozoa and mean spermatozoal velocity in ejaculated human semen

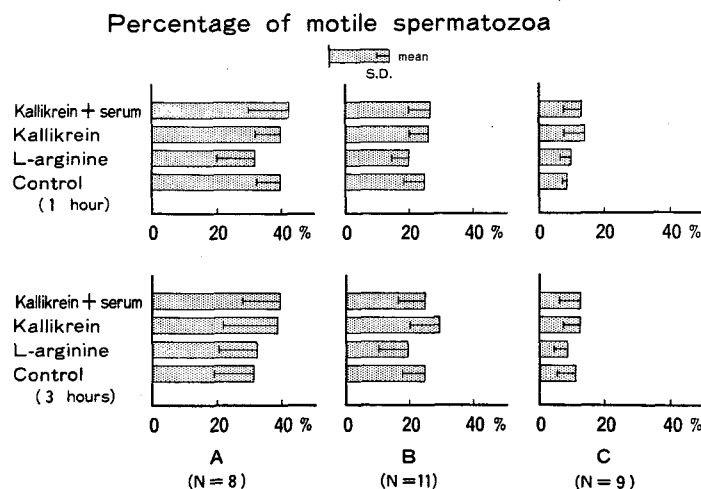


Fig. 7. Effects of in vitro additions of Kallikrein plus fresh human serum, Kallikrein and L-arginine compared with controls on the percentage of motile spermatozoa in human semen specimens, divided into three groups with the percentage of motile spermatozoa in controls after 1 hour incubation. ( $A \geq 30\%$ ,  $15\% \leq B < 30\%$ ,  $C < 15\%$ )

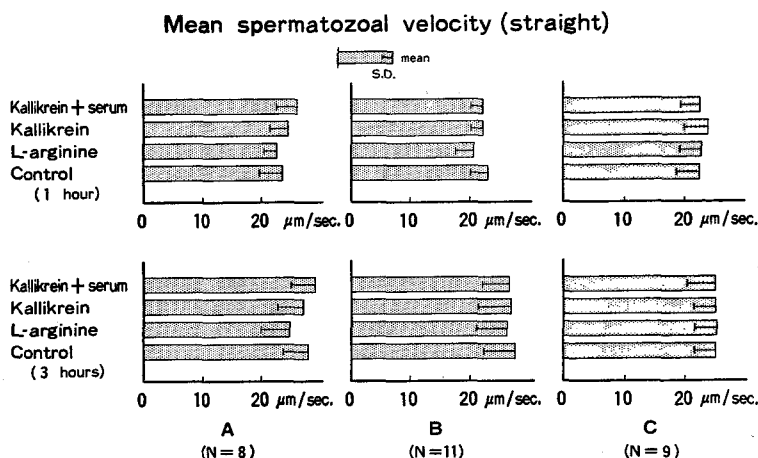


Fig. 8. Effects of in vitro additions of Kallikrein plus fresh human serum, Kallikrein and L-arginine compared with controls on the mean spermatozoal velocity (straight) in human semen specimens, divided into three groups with the percentage of motile spermatozoa in controls after 1 hour incubation. ( $A \geq 30\%$ ,  $15\% \leq B < 30\%$ ,  $C < 15\%$ )

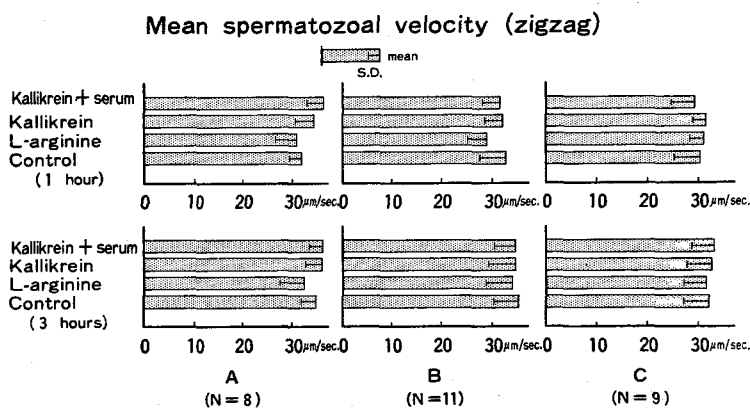


Fig. 9. Effects of in vitro additions of Kallikrein plus fresh human serum, Kallikrein and L-arginine compared with controls on the mean spermatozoal velocity (zigzag) in human semen specimens, divided into three groups with the percentage of motile spermatozoa in controls after 1 hour incubation. ( $A \geq 30\%$ ,  $15\% \leq B < 30\%$ ,  $C < 15\%$ )

#### 4. progesterone

添加1時間後の運動率  $22.4 \pm 12.3\%$ , 直線運動速度  $22.7 \pm 4.0 \mu\text{m/sec}$ , 折れ線運動速度  $31.7 \pm 4.4 \mu\text{m/sec}$  で, 3時間後はそれぞれ  $19.3 \pm 9.2\%$ ,  $27.1 \pm 4.8 \mu\text{m/sec}$ ,  $34.1 \pm 4.8 \mu\text{m/sec}$  であった。これらは control と有意差はなかった (Fig. 10)。

#### 5. prolactin

添加1時間後の運動率  $20.9 \pm 10.1\%$ , 直線運動速度  $22.3 \pm 3.9 \mu\text{m/sec}$ , 折れ線運動速度  $31.2 \pm 3.7 \mu\text{m/sec}$  で, 3時間後はそれぞれ  $18.0 \pm 11.7\%$ ,  $23.8 \pm 4.4 \mu\text{m/sec}$ ,  $31.8 \pm 5.9 \mu\text{m/sec}$  であった。control と比較して運動率はやや低下傾向を示したが有意差は認められなかった。しかし3時間後の直線運動速度は有意に低下していた (Fig. 10)。

sec で, 3時間後はそれぞれ  $18.0 \pm 11.7\%$ ,  $23.8 \pm 4.4 \mu\text{m/sec}$ ,  $31.8 \pm 5.9 \mu\text{m/sec}$  であった。control と比較して運動率はやや低下傾向を示したが有意差は認められなかった。しかし3時間後の直線運動速度は有意に低下していた (Fig. 10)。

#### 6. L-arginine

添加1時間後の精子運動率  $20.1 \pm 11.8\%$ , 直線運動速度  $22.3 \pm 3.3 \mu\text{m/sec}$ , 折れ線運動速度  $29.7 \pm 3.9 \mu\text{m/sec}$  で, 3時間後はそれぞれ  $19.8 \pm 13.1\%$ ,  $25.5 \mu\text{m/sec}$  で, 3時間後はそれぞれ  $19.8 \pm 13.1\%$ ,  $25.5 \mu\text{m/sec}$  であった。

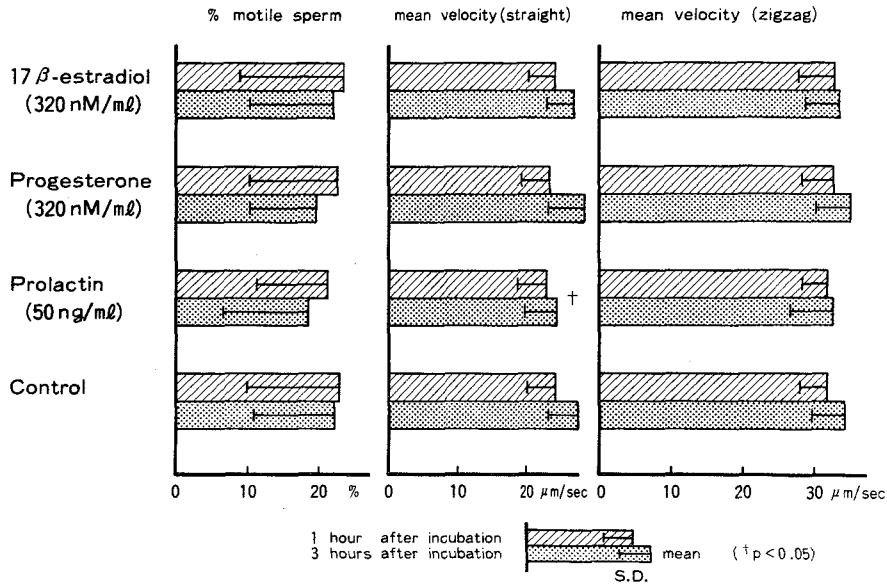


Fig. 10. Effects of in vitro additions of 17β-estradiol, progesterone and prolactin compared with controls on the percentage of motile spermatozoa and mean spermatozoal velocity in ejaculated human semen

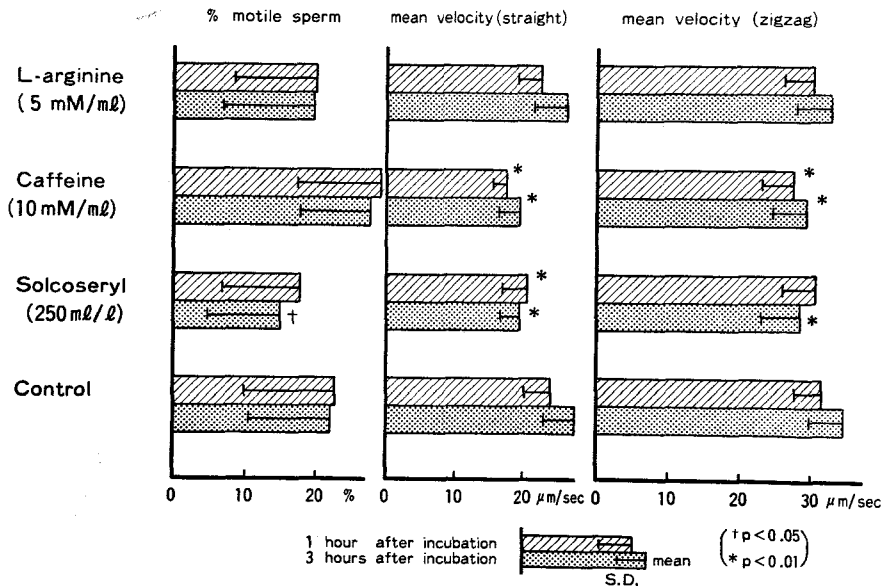


Fig. 11. Effects of in vitro additions of L-arginine, caffeine and Solcoseryl compared with controls on the percentage of motile spermatozoa and mean spermatozoal velocity in ejaculated human semen

±4.6 μm/sec, 32.1±4.9 μm/sec であった。これらの成績は control と比べ、わずかに低値であったが有意の差はなかった (Fig. 11)。また Kallikrein と同様、

運動率により A, B, C の 3 群に分け検討したが、精子運動率、運動速度とも群間に大きな特徴はなかった (Fig. 7, 8, 9)。



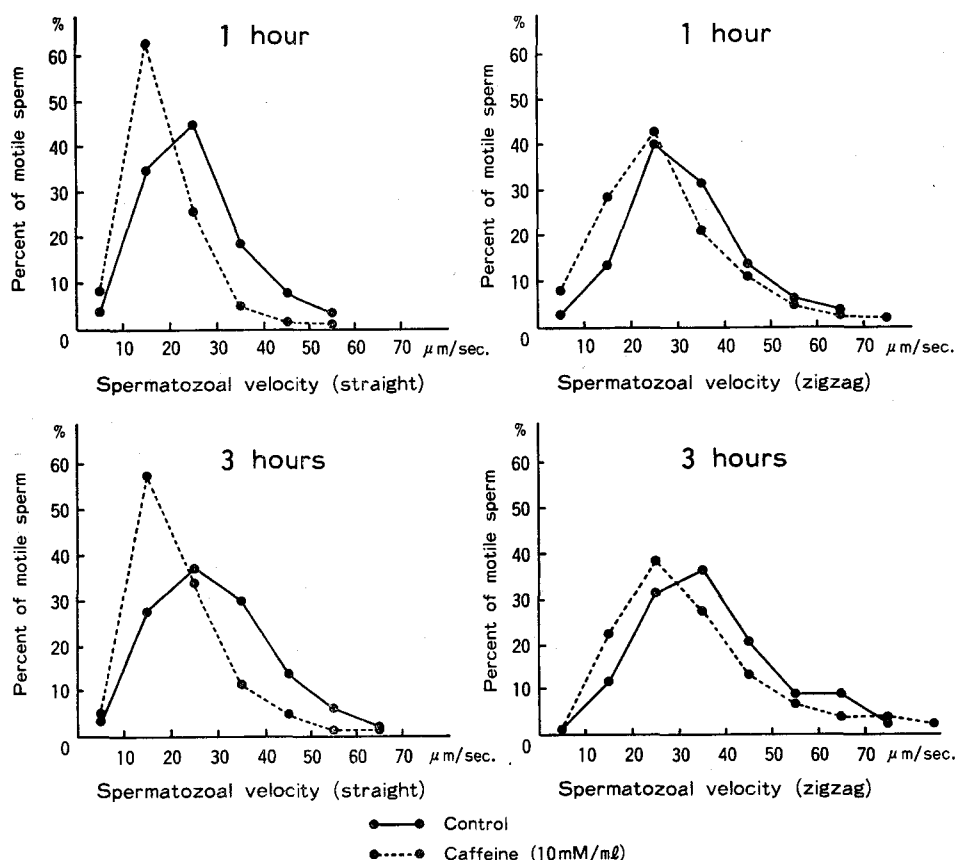


Fig. 12. Frequency distribution of spermatozoal velocities (straight and zigzag) of all motile spermatozoa in 28 specimens incubated with caffeine for 1 and 3 hours as compared with their controls. Each point indicates the mean value

## 7. caffeine

添加1時間後の精子運動率  $29.1 \pm 11.9\%$ , 直線運動速度  $17.1 \pm 2.1 \mu\text{m/sec}$ , 折れ線運動速度  $26.7 \pm 4.1 \mu\text{m/sec}$  で, 3時間後はそれぞれ  $27.9 \pm 10.5\%$ ,  $19.1 \pm 3.2 \mu\text{m/sec}$ ,  $28.4 \pm 8.7 \mu\text{m/sec}$  であった. control に比べて運動率は上昇傾向を示したが, 運動速度は両者ともに有意に低下していた (Fig. 11). この機序を探るため, 各精子の速度分布をみると, 添加1時間後, 3時間後で共通に, caffeine によって速度の遅い精子の比率が著明に増加することが明らかとなった (Fig. 12).

## 8. Solcoseryl

添加1時間後の精子運動率  $17.8 \pm 11.2\%$ , 直線運動速度  $20.1 \pm 3.6 \mu\text{m/sec}$ , 折れ線運動速度  $30.2 \pm 4.9 \mu\text{m/sec}$  で, 3時間後はそれぞれ  $14.8 \pm 10.3\%$ ,  $19.3 \pm 3.2 \mu\text{m/sec}$ ,  $27.8 \pm 5.3 \mu\text{m/sec}$  であった. 精子運動率は control と比べて低下傾向を示し, 特に3時間後は有

意の低下を示した. また両運動速度も1時間後の折れ線運動速度を除いて有意の低下が認められた (Fig. 11)

## 考 察

精子運動能が受精能と深いかわりがあることは周知の事実であるが, その動態を的確に表現することは非常に困難である. そのため, 日常の臨床で用いられる運動能の指標としては, 肉眼的観察という主観的判定法により, 精子運動率についてのみ検索されているのが実状である. しかし, これだけでは運動能の一面を見ているに過ぎず, 妊孕力をはかるパラメーターとして充分とは言えなかった. そこで著者は精子運動能を的確に, しかも客観性をもってとらえるために, 新しい MEP 法を開発<sup>1,2)</sup> し, 精子運動率だけでなく個々の精子の運動速度も算出し, より有用な指標とすることを考えた. さらにこの方法が発展すれば, 従来

は困難であった運動形式の計量化の可能性もあり、授精能をよりの確に反映するパラメーターが得られるものと考えている。

こうした新しい精液検査法の開発の努力とともに、男性不妊の研究分野では古くから精子運動能に影響をおよぼす多くの因子について検討がなされてきたが、中でも精子運動を賦活あるいは抑制する各種の薬剤についての報告は数多くみられる<sup>9)</sup>。

kininogen から kinin を遊離する酵素 kallikrein は血漿のほか各種臓器、体液にわたって広く存在する物質である。Schill<sup>4,9)</sup>は精子無力症患者の精液に種々の濃度の Kallikrein を加え、これにより精子運動率が上昇し、添加24時間後まで持続したことを報告している。そして、この Kallikrein の精子運動賦活作用が最大であったのは 1 KU/ml であり、これに kininogen source としての新鮮ヒト血清を加えると作用はさらに増大すると述べている。同様に Steiner<sup>6)</sup>、光川<sup>7)</sup>、Sato<sup>8)</sup>も Kallikrein 添加により精子運動率、平均精子運動速度が増加することを報告している。また Schill<sup>5,9)</sup>は Kallikrein が運動率を上昇させるだけでなく、very good forward progression sperm を増加させること、さらに運動率の増加は fructolysis の増加と平行することを観察している。Leidl<sup>10)</sup>も Kallikrein 添加により精子の酸素消費が増加すると述べており、これらは Kallikrein による精子代謝の増大を示すものであるとしている。そして、これらの本態としては、kinin による精子膜の透過性の亢進、kinin の物質移動の直接作用あるいは Kallikrein 処理精子細胞内 cyclic AMP 濃度の増大から示唆される細胞内代謝系の関与などが考えられている。

これらの報告に対して、著者の成績では Kallikrein 添加により精子運動率が上昇傾向を示したものの有意差はなく、精子運動速度については直線、折れ線ともに control とほぼ同等であった。また Yadweb らは 10 KU/ml, 100 KU/ml の Kallikrein 添加により精子運動率および子宮頸管粘液通過性の改善がなかったと述べ、Makler<sup>12)</sup>も本研究と類似の MEP 法の判定により、運動率、直線運動速度ともに Kallikrein 添加によって変化しなかったと報告している。このように Kallikrein 添加による精子運動賦活作用の有無については異なった結果が報告されているが、Schill<sup>13)</sup>は運動率の非常に良好な精液では kinin による精子運動賦活作用は明確でなく、またその逆に運動率の非常に悪い精液(主観法で20%以下)でも賦活作用を認めなかったが、中間的な運動率20~50%のものでは平均40%の運動率の上昇がみられ、kinin に対する効果が最も

良かったと述べており、対象精液の質により反応に相違があることを示唆している。そこで、今回の対象精液を MEP 法判定による運動率により3群に分けた、この際、前報<sup>2)</sup>に述べたように MEP 法による正常ヒト精子運動率は採取1時間後で、平均40%と、主観的判定法の成績に比し低値であることから、今回の対象精液を採取2時間後判定で、便宜上、A群(30%以上)、B群(15~30%)、C群(15%未満)に分け、Kallikrein の効果を検討した。その結果、運動率の良好なA群で精子運動率の上昇傾向がみられたのに対し、運動率の低いB、C群では control と差がなかった。このことから運動率の悪い精液より良い精液の方に Kallikrein の運動賦活作用が認められるものと考えられた。一方、男性不妊患者への Kallikrein 投与による Schillen<sup>14)</sup>、Schill<sup>15)</sup>、Kamidono<sup>16)</sup>の in vivo study では、量的質的精子運動の改善、quick moving spermatozoa の増加、精子形態の改善が共通して報告されており、その機序として睪丸、副性器の血流改善<sup>17)</sup>、血管透過性の亢進による局所栄養状態の改善、blood-testis barrier 透過性亢進による Sertoli 細胞の機能への影響<sup>18)</sup>、細胞増殖の賦活作用<sup>19)</sup>等のさまざまな原因による spermatogenesis への作用が考えられている。いずれにしても、in vivo における Kallikrein の作用機序は複雑なもので、未だその本態は明確でない。今後さらに症例を重ね、対象患者あるいは精液の質による Kallikrein の効果の違いを in vitro はもちろん、in vivo においても MEP 法などの客観的評価法により明らかにしていく必要があると考える。

次に 17  $\beta$ -estradiol については、精子運動率、精子運動速度とも変化を示さなかったが、Hyne ら<sup>20,21)</sup>も洗浄精子に 320 nM/ml の 17  $\beta$ -estradiol を加え、精子運動率に変化なく、sperm penetration test でも sperm migration が刺激されなかったと同様の報告をしている。これに対し、Beck<sup>22)</sup>は Tyrode-Ringer solution を medium とした sperm penetration test で生理的濃度 (0.5 ng/ml) の 17  $\beta$ -estradiol は sperm migration を賦活したと述べ、Cheng<sup>23)</sup>も medium に modified Tyrode's solution を用いると 320 nM/ml の 17  $\beta$ -estradiol は sperm migration を増加させたと報告している。さらに、この sperm migration の増加は Hyne<sup>20,21)</sup>の報告と同様に空腹時ヒト血清を medium に用いた場合には観察されなかったことから、空腹時ヒト血清には 17  $\beta$ -estradiol による sperm migration の賦活に拮抗する成分が含まれているのだろうと述べている。

progesterone についても、今回の実験では control

と差がなかったが、これに対し kesserü<sup>24)</sup>は頸管粘液を用いた sperm penetration test で progesterone による sperm migration の抑制と qualitative motility の低下を観察し、Hyne<sup>21)</sup>も progesterone は洗浄精子の呼吸、解糖、運動率を抑制すると報告している。そして、その機序は progesterone が精子の原形質膜の透過性を亢進させ、解糖や酸化の過程に必要な補因子の消耗を促進させるためであるとしている。これら洗浄精子による実験結果から、17  $\beta$ -estradiol, progesterone の2つの steroid hormone は Tyrode's solution の中では精子運動に変化を与えるが、精漿中では有意の変化を示さないとされる。これは精漿中にも空腹時血清と類似の steroid hormone の作用に関連する何らかの因子が存在するためではないかと考えられた。

男性不妊における prolactin の役割については未解決の部分が多い。Segal<sup>25,26)</sup>は不妊患者に血中あるいは精漿中の prolactin 値の高いものが多かったと報告し、Gray<sup>27)</sup>は高 prolactin 血症が正常群に比べ乏精子症群、無精子症群に多くみられるが、形態学的には高 prolactin 血症群の方が正常精子の比率が高いと述べている。また Falaschi<sup>28)</sup>も血中 prolactin 値と精子濃度の間に相関はないが、高 prolactin 血症は対照群よりも乏精子症群に多くみられたと報告している。これらに対し、Rjosk<sup>29)</sup>は男性不妊患者のうち血中 prolactin 高値を示すものはわずかで、精子数、精子運動率とも相関がなく、血中 prolactin と男性不妊の関係は否定的であると述べている。一方、in vitro 実験では、Shah<sup>30)</sup>が洗浄精子に生理的濃度の prolactin を加えると、cyclic AMP 濃度の上昇、果糖利用、ブドウ糖の酸化の亢進がみられたと報告し、prolactin のエネルギー代謝への関与を示唆している。しかし、今回の添加実験では運動率がやや低下傾向を示し、直線運動速度は3時間後に有意の低下がみられ、精子運動の抑制が観察された。これは洗浄精子の実験と異なり、精漿中の prolactin にさらに 50 ng/ml 添加したため、最終的に高 prolactin の状態となって運動性を抑制したものと想定され、この事は高 prolactin 状態と男性不妊との何らかの関連性を示唆するものと考えている。

1962年に Krampitz<sup>31)</sup>が正常精液には乏精子症や無精子症患者精液に比べ高濃度の arginine が存在することを報告し、Papp<sup>32)</sup>も同様の結果を得て、その原因を正常精液では arginase 活性が低いためであろうと予測している。これらのことから男性不妊の臨床で乏精子症や精子無力症患者に非必須アミノ酸である

arginine を経口投与する治療法が試みられ、効果があったとする幾つかの報告<sup>33~35)</sup>もみられるが、無効という成績<sup>36,37)</sup>もあり一定の評価を受けていない。in vitro 実験では、Keller<sup>38)</sup>がヒト精子に L-arginine を加え、運動率の低い検体ほど運動賦活がみられたと報告している。そして、その程度はもとの運動率と反比例し、L-arginine 添加の至適濃度は 23°C と 37°C で 0.004 M であったと述べている。また、この作用は D-arginine, L-ornithine, L-homoarginine 等では認められず、L-arginine だけにみられたとも述べている。しかし、今回の L-arginine 添加では精子運動率、精子運動速度とも平均値として有意な変化はみられなかった。また、運動率により3群に分類して検討しても、群間に特徴はなく運動率の低い群に運動の賦活が認められるということとはなかった。しかし、症例数も少ないため、今後さらに精子無力症患者精液を対象として L-arginine の作用を検討していく必要があると思われる。

caffeine は精子運動に影響を与えるといわれるメチルキサンチンの中でも最も多くの検討がなされている化合物である。これが精子の運動性を高め、呼吸を促進することを初めてウシ精液で観察したのは Drevious<sup>39)</sup>、Garbers<sup>40)</sup>であった。その後、ヒト精子でも同様に運動率を上昇させ、forward progression を促進することを Bunge<sup>41)</sup>、Haesungcharern<sup>42)</sup>、Schill<sup>43)</sup> および Schoenfeld<sup>43)</sup> が報告した。彼らによると caffeine による運動率の増加は初期値に対して30~50%であったが、今回の実験では平均27%の増加がみられ、Makler<sup>12)</sup>もMEP法を用いて対象症例の2/3に初期値に対して30~50%の運動率増加をみたと報告している。また、精子運動速度については Makler<sup>12)</sup>は変化がなかったと述べているが、今回の実験では直線、折れ線運動速度とも平均すると有意に低下した。これを各精子の運動速度分布でみると caffeine 添加により速度の遅い精子の比率が顕著に増加していることがわかる。さらに Makler<sup>12)</sup>の超生体染色による観察からも、これらの機序は caffeine によって非運動生存精子が活性化され、ゆっくりとした運動を始めるために、運動率は上昇するが運動速度は平均するとかえって低くなったものと考えられる。一方、caffeine は精子の解糖作用に働く酵素である cyclic nucleotide phosphodiesterase の inhibitor<sup>44)</sup>と考えられているが、Garbers<sup>45)</sup>は caffeine 添加の実験からウシ精子の運動能および代謝の少なくとも一部は cyclic AMP あるいは cyclic GMP により制御されていると述べている。また Hoskins<sup>46)</sup>も哺乳類の精液に caffeine を加えると数分

間で精子内の cyclic AMP 濃度が上昇することから、これが cyclic AMP 依存性の protein kinase を活性化し、caffeine による精子運動賦活作用の引き金になると推測している。

Mattheusら<sup>47)</sup>は精子無力症患者精液に Solcoseryl を添加し、運動率の低下したものが17%に対して上昇したものが26%あり、人工授精の際の保護剤として Solcoseryl は有用であると述べている。また、その続報として Heiseら<sup>48)</sup>が Solcoseryl を不妊患者に投与し、44%の精子無力症患者の精液所見が一時的に正常化したと報告している。しかし、今回の実験では彼らが最も効果があったとする 250 ml/l の濃度でも精子運動率、運動速度ともに control に比して低値となり、少なくとも in vitro では Solcoseryl は精子運動を抑制するという結果であった。

## 結 語

各種薬剤が精子運動におよぼす影響を検討するため、客観的な精液検査法である MEP 法を用いて in vitro の添加実験を行ない以下のような結果を得た。

1) Kallikrein により精子運動率は上昇傾向を示したが、統計学的に有意ではなかった。この上昇は運動率の良好な精液に主として認められた。平均精子運動速度には変化はなかった。

2) 17  $\beta$ -estradiol と proprogesterone の2つの steroid hormone は精漿中では精子運動に影響を与えなかった。

3) prolactin により運動率はやや減少し、直線運動速度も有意に低下した。これは高 prolactin 状態と男性不妊の関連性を示唆するものと考えられた。

4) L-arginine は精子運動に変化を与えなかった。

5) caffeine により精子運動率は初期値に対し平均27%増加したが、平均精子運動速度はかえって有意に低下した。これは非運動生存精子が緩徐な運動を始めるためと考えられた。

6) Solcoseryl は精子運動を抑制した。

稿を終えるにあたり、終始御指導ならびに御校閲を賜りました恩師石神襄次教授に深甚なる感謝の意を表します。また本研究に際し直接御指導いただきました守殿貞夫助教授に深謝するとともに御協力をいただいた教室の諸先生方ならびに北村新三助教授をはじめとする神戸大学計算センターの方々に深く感謝いたします。

なお本論文の要旨は第33回日本泌尿器科学会西日本総会において発表した。

## 文 献

- 1) 羽間 稔・松本 修・高田健一・富岡 収・守殿貞夫・石神襄次：Multiple exposure photography method を用いた精子運動の研究（第1報）日不妊誌 27：104～111, 1982
- 2) 羽間 稔・岡田 弘・松本 修・高田健一・富岡 収・守殿貞夫・石神襄次・北村新三・福島 徹：Multiple exposure photography method を用いた精子運動の研究（第2報）—コンピューター解析による半自動化とポラロイド写真による臨床応用—西日泌尿 第44巻, suppl. 掲載予定
- 3) Amelar RD, Dubin L, Schoenfeld C: Sperm motility. Fertil Steril 34: 197～215, 1980
- 4) Schill WB: Stimulation of sperm motility by kinins in fresh and 24 hours aged human ejaculates. Andrologia 7: 135～139, 1975
- 5) Schill WB: Caffeine- and kallikrein-induced stimulation of human sperm motility: a comparative study. Andrologia 7: 229～236, 1975
- 6) Steiner R, Hofmann N, Hartmann R, Kaufmann R: The influence of Kallikrein on the velocity of human spermatozoa measured by laser-doppler-spectroscopy. In: Kininogeneses-Kallikrein 4, Haberland, G.L. p.229～235, Schattauer, Stuttgart-New York, 1977
- 7) 光川史郎・石井延久・白井将文：精子運動と Kallikrein. 日不妊誌 21: 195～197, 1976
- 8) Sato H: Studies on the components of kallikrein-kinin system and treatment of male infertility. Keio J Med 29: 19～38, 1980
- 9) Schill WB: Increased fructolysis of kallikrein-stimulated human spermatozoa. Andrologia 7: 105～107, 1975
- 10) Leidl W, Prinzen R, Schill WB, Fritz H: The effect of Kallikrein on motility and metabolism of spermatozoa in vitro. In: Kininogeneses-Kallikrein 2, Haberland, G.L. p.33～40, Schattauer, Stuttgart-New York, 1975
- 11) Schill WB: Kallikrein as a therapeutical means in the treatment of male infertility. In: Kininogeneses-Kallikrein 4, Haberland, G.L. p.251～280, Schattauer, Stuttgart-New York, 1977
- 12) Makler A, Makler E, Itzkovitz J, Brandes JM: Factors affecting sperm motility. IV. incubation of human semen with caffeine, kallikrein, and

- other metabolically active compounds. *Fertil Steril* 33: 624~630, 1980
- 13) Schill WB, Wallner O, Palm S, Fritz H: Kinin stimulation of spermatozoa motility and migration in cervical mucus. In: *Human semen and fertility regulation in men*, Hafez, E.S.E., p. 442~451, Mosby, Saint Louis, 1976
  - 14) Schirren C, Schill WB, Hofmann N: The influence of Kallikrein on semen parameters of subfertile patients. In: *Kininogeneses - Kallikrein 2*, Haberland, G.L. p.111~127, Schattauer, Stuttgart-New York, 1975
  - 15) Schill WB: Influence of Kallikrein on sperm count and sperm motility in patients with infertility problems: preliminary results during parenteral and oral application with special reference to asthenozoospermia and oligozoospermia. In: *Kininogeneses-Kallikrein 2*, Haberland, G.L. p.129~146, Schattauer, Stuttgart-New York, 1975
  - 16) Kamidono S, Hazama M, Matsumoto O, Takada KI, Tomioka O, Ishigami J: Kallikrein and male subfertility. Usefulness of high-unit Kallikrein tablets. *Andrologia* 13: 108~120, 1981
  - 17) Tauber A, Petrowicz O, Erhardt W, Musselmann R, Blumel G: Experimental study in rats on the influence of Kallikrein on the testicular blood flow. In: *Kininogeneses-Kallikrein 4*, Haberland, G.L. p.225~228, Schattauer, Stuttgart-New York, 1977
  - 18) Rohen JW, Buschhüter H: Karyometric measurements on the Sertoli cell nuclei in Kallikrein-treated albino rats. In: *Kininogeneses-Kallikrein 2*, Haberland, G.L. p.85~97, Schattauer, Stuttgart-New York, 1975
  - 19) Rixon RH, Whitfield JF, Bayliss J: The stimulation of mitotic activity in the thymus and bone marrow of rats by kallikrein. *Horm Metab Res* 3: 279~284, 1972
  - 20) Hyne RV, Boettcher B: Binding of steroids to human spermatozoa and its possible role in contraception. *Fertil Steril* 30: 322~328, 1978
  - 21) Hyne RV, Murdoch RN, Boettcher B: The metabolism and motility of human spermatozoa in the presence of steroid hormones and synthetic progestagens. *J Reprod Fert* 53: 315~322, 1978
  - 22) Beck KJ, Herschel S, Hungershofer R, Schwinger E: The effect of steroid hormones on motility and selective migration of X- and Y- bearing human spermatozoa. *Fertil Steril* 27: 407~412, 1976
  - 23) Cheng CY, Boettcher B: The effect of steroids on the in vitro migration of washed human spermatozoa in modified Tyrode's solution or in fasting human blood serum. *Fertil Steril* 32: 566~570, 1979
  - 24) Kesserü E, Camacho-Ortega P, Laudahn G, Schöpflin G: In vitro action of progestogens on sperm migration in human cervical mucus. *Fertil Steril* 26: 57~61, 1975
  - 25) Segal S, Polishuk WZ, Ben-David M: Hyperprolactinemic male infertility. *Fertil Steril* 27: 1425~1427, 1976
  - 26) Segal S, Ron M, Laufer N, Ben-David M: Prolactin in seminal plasma of infertile men. *Arch Androl* 1: 49~52, 1978
  - 27) Gray P, Franken DR, Slabber CF, Potgieter GM: A possible relationship between prolactin and spermatogenesis in humans. *Andrologia* 13: 127~130, 1981
  - 28) Falaschi P, Frajese G, Rocco A, Besser GM, Rees LH: Prolactin and idiopathic oligospermia. *Lancet* 1: 667, 1979
  - 29) Rjosk HK, Schill WB: Serum prolactin in male infertility. *Andrologia* 11: 297~304, 1979
  - 30) Shah GV, Dasai RB, Sheth AR: Effect of prolactin on metabolism of human spermatozoa. *Fertil Steril* 27: 1292~1294, 1976
  - 31) Krampitz G, Doepfner R: Determination of free aminoacids in human ejaculate by ion exchange chromatography. *Nature* 194: 684~686, 1962
  - 32) Papp G, Grof J, Molnár J, Jambor E: Die Rolle des Arginingehaltes und der Arginase-Aktivität in der Fertilität. *Andrologia* 11: 37~41, 1979
  - 33) Ishigami J: Nonendocrinological drugs in the treatment of male infertility. In: *Excerpta Medica International congress series No.133*, p.802~804, Stockholm, 1966

- 34) Tanimura J: Studies on arginine in human semen. part III. The influences of several drugs on male infertility. Bull Osaka Med Sch 13: 90~100, 1967
- 35) Schachter A, Goldman JA, Zukerman Z: Treatment of oligospermia with the amino acid arginine. J Urol 110: 311~313, 1973
- 36) Mroueh A: Effect of arginine on oligospermia. Fertil Steril 21: 217~219, 1970
- 37) Jungling ML, Bunge RG: The treatment of spermatogenic arrest with arginine. Fertil Steril 27: 282~283, 1976
- 38) Keller DW, Polakoski KL: L-arginine stimulation of human sperm motility in vitro. Biol Reprod 13: 154~157, 1975
- 39) Drevious LO: The 'sperm-rise' test. J Reprod Fert 24: 427~429, 1971
- 40) Garbers DL, First NL, Sullivan JJ, Lardy HA: Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoan respiration and motility by caffeine. Biol Reprod 5: 336~339, 1971
- 41) Bunge RG: Caffeine-stimulation of ejaculated human spermatozoa. Urology 1: 371, 1973
- 42) Haesungcharern A, Chulavatnatol M: Stimulation of human spermatozoal motility by caffeine. Fertil Steril 24: 662~665, 1973
- 43) Schoenfeld C, Amelar RD, Dubin L: Stimulation of ejaculated human spermatozoa by caffeine. Fertil Steril 26: 158~161, 1975
- 44) Hardman JG, Robison GA, Sutherland EW: Cyclic nucleotides. Annu Rev Physiol 33: 311~336, 1971
- 45) Garbers DL, Lust WD, First NL, Lardy HA: Effects of phosphodiesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. Biochemistry 10: 1825~1831, 1971
- 46) Hoskins DD, Casillas ER: Function of cyclic nucleotides in mammalian spermatozoa. In: Handbook of physiology, Hamilton, D. W, p. 453~460, American Physiological Society, Washington DC, 1975
- 47) Mattheus A, Heise H, Hofmann R: Zur Bedeutung des Solcoseryl bei Infertilität. 1. Mitteilung: Der Einfluß von Solcoseryl auf die Spermatozoenmotilität in vitro. Andrologia 12: 43~48, 1980
- 48) Heise H, Mattheus A, Hofmann R: Zur Bedeutung des Solcoseryl bei Infertilität. 2. Mitteilung: Die Wirkung von Solcoseryl bei pathologischen Spermogramm befunden in vivo. Andrologia 12: 332~337, 1980

(1982年1月18日受付)